Aus dem Anatomischen Institut der Philipps-Universität
Marburg/Lahn
Lehrstuhl I: Prof.Dr. UNSICKER

NEURONALE TRANSFORMATION UND REINNERVATION VON ADRENALEN CHROMAFFINEN ZELLEN IN TRANSPLANTATEN IN DER VORDEREN AUGENKAMMER DES MEERSCHWEINCHENS

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde
des Fachbereichs Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

DIETRICH TSCHECHNE

aus Kiel

Marburg 1978

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546006_0075

Aus dem Anatomischen Institut der Philipps-Universität
Marburg/Lahn
Lehrstuhl I: Prof.Dr. UNSICKER

NEURONALE TRANSFORMATION UND REINNERVATION VON ADRENALEN CHROMAFFINEN ZELLEN IN TRANSPLANTATEN IN DER VORDEREN AUGENKAMMER DES MEERSCHWEINCHENS

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde
des Fachbereichs Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

DIETRICH TSCHECHNE

aus Kiel

Marburg 1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen von dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 15.12.1978

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. F. NEURATH
Referent: Prof. Dr. med. K. UNSICKER
Correferent: Prof. Dr. med. dent. BERNHARDT

Meinen Eltern gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. MATERIAL UND METHODEN	5
a) Tiermaterial	5
b) Operationstechnik	5
c) Spaltlampenuntersuchungen	5
d) Elektronenmikroskopie	6
e) 5- und 6-Hydroxydopamin	6
f) Catecholamin-Histochemie	7
g) Benutzte Substanzen	7
3. BEFUNDE	8
a) Spaltlampenuntersuchungen	8
b) Catecholamin-Histochemie	8
c) Beobachtungen an Semi-Dünnschnitten	10
d) Elektronenmikroskopie	10
A. Nebennierenmark in situ	10
B. Neuronale Transformation von chromaffinen Zellen im Transplantat	11
C. M. sphincter und M. dilatator pupillae: Kontrolluntersuchung	15
D. Beziehung der Fortsätze von transplantierten chromaffinen Zellen zu glatten Muskelzellen der Mm. sphincter et dilatator pupillae	18
E. Reinnervation von transplantierten chromaffinen Zellen	21
F. Kontakte chromaffiner Zellen untereinander	21
4. DISKUSSION	27
A. Neuronale Transformation	28
B. Vergleich transplantierter chromaffiner Zellen und kleingranulärer Zellen in sympathischen Ganglien	30

Seite

C. Bildung der Speichervesikel und das Problem der Speicherung von A und NA in einem Axon 32

D. Reinnervation transplantierter chromaffiner Zellen 34

5. ZUSAMMENFASSUNG 41

6. LITERATURVERZEICHNIS 43

1. EINLEITUNG

Die allen Zellen eigene Fähigkeit, miteinander zu kommunizieren, ist bei Nervenzellen durch die Entwicklung von Zellfortsätzen und Synapsen in besonders hohem Maße ausgebildet. Auf der spezifischen Anordnung vieler Milliarden von Zellfortsätzen und Synapsen beruht in erster Linie die Komplexität des Gehirns. Das Problem, wie Neurone synaptische Verbindungen mit hoher Präzision bilden, gehört zu den herausforderndsten der Neurobiologie. Zur Analyse der Faktoren, welche die Spezifität der Synapsenbildung bedingen, sind zwei Wege beschritten worden, die wir als den molekularbiologischen und den phänomenologischen Ansatz bezeichnen möchten. Der molekularbiologische Ansatz verfolgt das Ziel, die molekularen Partner der Zelloberflächen, welche beim Zellerkennungsprozeß miteinander agieren, zu charakterisieren. Die Untersuchungen von Barondes und Mitarbeitern zur Interaktion von primitiven Metazoen und Mikroorganismen (Barondes, 1975), Mosconas Analyse der löslichen Faktoren, welche die Aggregation dissoziierter neuronaler Zellen beeinflussen (Moscona, 1964), Pfenningers Lectin-Bindungsstudien an isolierten Nervenzellen in vitro (Pfenninger und Rees, 1976, und persönliche Mitteilung) und Gombos' Untersuchungen an Glycoconjugaten im sich entwickelnden Kleinhirn (Gombos et al., 1978) müssen an dieser Stelle genannt werden. Der phänomenologische Weg, von Langley und Anderson um die Jahrhundertwende bereits beschritten (Langley 1897, 1899; Langley und Anderson, 19o4a, b), führt über Beobachtungen der Synapsenbildung während der Embryonalentwicklung, bei Regenerationsvorgängen und in vitro zur Analyse der Bedingungen, die eine spezifische

oder unspezifische Synaptogenese bewirken. Dabei bevorzugt man ebenfalls Untersuchungen an Modellen wie z.B. das retino-tectale System (Jacobson, 1976; Chung und Cooke, 1978), Neurone des peripheren autonomen Nervensystems(PANS) in vivo (Langley, 1897, 1899) und in vitro (O'Lague et al., 1974; Bunge, 1976, Crain, 1976) oder die Kombination von neuronalen und Muskel-Zellen in vivo (Bennett et al., 1973a, b; McLachlan, 1974) und in vitro (Chamley et al., Nelson, 1975; Fischbach et al., 1976; Hill et al., 1976; Landis, 1976; Puro und Nirenberg, 1976).

Morphologische und physiologische Beobachtungen an Neuronen des ZNS und PANS haben zahlreiche Hinweise dafür geliefert, daß die Synapsenbildung in vitro ebenso spezifisch erfolgen kann wie in vivo. So konnten z.B. Crain und Peterson (1976) zeigen, daß die Neuriten von Spinalganglien-Nervenzellen in vitro Synapsen in den eng umschriebenen Regionen von Rückenmark und Hirnstamm bilden, die auch unter in vivo-Bedingungen derartige Synapsen erhalten. Dissoziierte sympathische Neurone bilden zwar Synapsen mit Neuronen aus der vorderen Hälfte des Rückenmarks, nicht aber mit solchen aus der Hirnrinde (Olson und Bunge, 1973).

Andere Untersuchungen haben jedoch auch gezeigt, daß in vitro zwischen Neuronen des PANS synaptische Kontakte geknüpft werden können, die unter in vivo-Bedingungen noch nicht gefunden wurden und damit deutlich gemacht, daß eine einfache Übertragung von in vitro-Ergebnissen auf die in vivo-Situation problematisch sein kann. So konnten die Arbeitsgruppen von Furshpan, Nurse, O'Lague und Potter sowie

Bunge unabhängig voneinander zeigen, daß dissoziierte sympathische Neurone in vitro adrenerge, cholinerge und gemischt adrenerg-cholinerge Synapsen bilden können, wobei die Synthese des cholinergen Transmitters von nicht-neuronalen Zellen in den Kulturen determiniert wird (O'Lague et al., 1974; Rees und Bunge, 1974; Nurse und O'Lague, 1975; Johnson et al., 1976; Landis, 1976). Unsicker et al. (1977a, 1978a) beobachteten in kombinierten Kulturen von cholinergen Ciliarganglien bzw. überwiegend adrenergen Ganglien des Grenzstrangs und dissoziierten chromaffinen Zellen, die in situ von präganglionären cholinergen Nervenfasern innerviert werden (Feldberg et al., 1934; Coupland, 1965), die Bildung von cholinergen und adrenergen Synapsen. Die letztgenannten Untersuchungen werfen die Frage auf, ob die Ursache für die "unphysiologische" Synapsenbildung an chromaffinen Zellen im in vitro-Millieu zu suchen ist oder ob derartige "unphysiologische" Kontakte auch in vivo geknüpft werden können.
Zur Beantwortung dieser Frage haben wir chromaffine Zellen in die vordere Augenkammer transplantiert und ihre Reinnervation durch die aus dem Ciliarganglion stammenden cholinergen Nerven der Iris und aus dem Halsgrenzstrang zur Iris ziehende adrenerge Nerven studiert.

Diese Arbeit enthält ferner Beobachtungen über die Fortsatzbildung ("neuronale Transformation") von transplantierten chromaffinen Zellen und die Bildung spezifischer Kontakte zwischen diesen Fortsätzen und denervierten glatten Muskelzellen der Mm. sphincter et dilatator pupillae.

In früheren Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, daß adrenale

chromaffine Zellen unter verschiedenen experimentellen Bedingungen Fortsätze bilden können und sich in Zellen transformieren lassen, die morphologische Eigentümlichkeiten von sympathischen adrenergen Neuronen oder "small granule-containing cells" (Literatur in der Diskussion) aufweisen. Olson und Malmfors (1970) transplantierten Nebennierenmark (NNM) adulter Ratten in die vordere Augenkammer und beobachteten unter Anwendung der Falck-Hillarp-Methode zur Darstellung von Catecholaminen (CA), daß sich ausgehend von chromaffinen Zellen ein dichtes Netz fluoreszierender Fortsätze über die zuvor sympathisch denervierte Iris ausbreitete. Ultrastrukturelle Untersuchungen wurden von diesen Autoren nicht durchgeführt, so daß offen blieb, ob diese Fortsätze von Adrenalin (A) - oder Noradrenalin (NA) - speichernden Zellen ausgingen, welche Typen von Speichergranula sie enthielten und welche Beziehungen sie zur denervierten Irismuskulatur (Gefäße, M. dilatator pupillae) aufnahmen.

Unsicker et al. (1978b) konnten zeigen, daß in Zellkulturen das Auswachsen von Fortsätzen bei chromaffinen Zellen junger Ratten durch Nerve Growth Factor (NGF) stimuliert und durch Dexamethason unterdrückt werden kann. Ein derartiger Effekt von NGF ließ sich an chromaffinen Zellen neugeborener Meerschweinchen in vitro nicht nachweisen (B. Tschechne, in Vorbereitung). Um so erstaunlicher war daher unsere Beobachtung, daß in Transplantaten in die vordere Augenkammer chromaffine Zellen adulter Meerschweinchen Fortsätze bilden, ein Befund, der vermuten läßt, daß auch andere Faktoren als NGF das Fortsatzwachstum adrenaler chromaffiner Zellen stimulierend beeinflussen können.

2. MATERIAL UND METHODEN

a. Tiermaterial

17 adulte weibliche Albino-Meerschweinchen eines Inzuchtstammes mit einem Körpergewicht von ca. 350-650 g dienten als Versuchstiere, davon 5 als Kontrollen.

b. Operationstechnik

Die Tiere wurden mit Ketanest^{R} (3 ml/kg) i.p. und Äther anästhesiert. Danach wurde die Bauchdecke durch einen Flankenschnitt auf der linken Seite eröffnet. Die linke Nebenniere (NN) wurde dargestellt, nach Abklemmen der Gefäße entfernt und in eine sterile, mit eisgekühlter Hanks' Balanced Salt Solution gefüllte Petrischale gelegt. Dann wurde das Mark unter einem binokularen Mikroskop sorgfältig von der Rinde getrennt und in kleinere Teile zerschnitten. Nach Oberflächenanästhesie mit einigen Tropfen einer 3 %igen Pantocain^{R}-Lösung eröffneten wir die vordere Augenkammer des linken Auges durch einen Schnitt am oberen Limbus corneae und führten die Nebennierenmark-Stücke vorsichtig in den Iridocornealwinkel ein.
Bei 7 Tieren wurde 3-5 Tage vor der Transplantation das linke Ganglion cervicale superius zusammen mit 5 mm des präganglionären Strangs und 5 mm der postganglionären Fasern entfernt.

c. Spaltlampenuntersuchung

Zur Prüfung der Revaskularisierung der Transplantate wurden die Augen 2 Tage nach der Operation mit der Spaltlampe untersucht.

d. Elektronenmikroskopie

Nach 4, 8 oder 12 Wochen wurden die Tiere mit 200 ml einer eisgekühlten 3,5 %igen phosphatgepufferten (o,1 M) Glutaraldehydlösung retrograd über die Aorta descendens perfundiert. Linkes und rechtes Auge wurden entnommen, die hintere Bulbushälfte und die Linse entfernt und die vordere Bulbushälfte in 1-2 mm große Stücke zerschnitten. Diese Gewebestücke wurden für eine Stunde in der phosphatgepufferten Glutaraldehydlösung bei 4^{o} C belassen. Danach erfolgten die Spülung in o,1 M Phosphatpuffer (2 Std.), Nachfixierung in wässrigem 2 %igem OsO_4 (2 Std.), Entwässerung der Stücke in einer aufsteigenden Äthanolreihe sowie die Einbettung in Araldit.
Die Nebennieren der Kontrolltiere wurden auf die gleiche Weise eingebettet.
Die auf einem Reichert-Sitte Mikrotom OmU_2 angefertigten Dünnschnitte wurden jeweils 5 min. mit Uranylacetat (in 70 %igem Methanol) und Bleicitrat (Reynolds, 1963) kontrastiert und in den Elektronenmikroskopen Zeiss EM 9A und Siemens 101 untersucht. Zur Orientierung dienten uns 1-2 um dicke Schnitte, die mit Azur II-Methylenblau (Richardson et al., 196o) gefärbt wurden.

e. 5- und 6-Hydroxydopamin (5- und 6-OHDA)-Behandlung

2 sympathektomierten und 2 nicht-sympathektomierten Tieren wurde 30, 18 und 6 Std. vor der Tötung je 300 mg/kg 5-OHDA-hydrochlorid i.p. injiziert, das zuvor mit einer geringen Menge Ascorbinsäure in 1 ml Hanks' Balanced Salt Solution gelöst worden war. 5 Tiere erhielten 12 Std. und unmittelbar vor der Perfusion je 100 mg/kg 6-OHDA-hydrochlorid i.p..

f. Catecholamin-Histochemie

Irides aus Augen, die ein Transplantat erhalten hatten, sowie Augen von sympathektomierten und Kontrolltieren wurden als Häutchenpräparate zur Darstellung der spezifischen CA-Fluoreszenz in Glyoxylsäure (De la Torre und Surgeon, 1976) inkubiert. Zur Untersuchung der Präparate benutzten wir das Zeiss Universal-Fluoreszenzmikroskop mit Epiillumineszenz.

g. Benutzte Substanzen

5- und 6-OHDA-hydrochlorid (Labkemi, Schweden)

3. BEFUNDE

a. Spaltlampen-Untersuchung

24 Std. nach der Operation waren die Corneae trübe, nach 2-3 Tagen jedoch wieder transparent, so daß erste Anzeichen für eine Revaskularisierung der Transplantate, ausgehend von den Gefäßen der Iris, erkennbar waren.

b. Catecholamin-Histochemie

Die Irides von Kontrolltieren zeigten einen dichten adrenergen Grundplexus, bestehend aus varikösen Nervenendigungen und glatten, nichtterminalen Axonen (vgl. Olson und Malmfors, 1970). Nach Entfernung des Ganglion cervicale superius fehlten adrenerge Nerven in der Iris.

4 Wochen nach der Transplantation zeigten die auf sympathektomierte Irides transplantierten Stücke von Nebennierenmark eine intensiv hellgelbe Fluoreszenz, ohne daß im Zentrum der Transplantate Einzelheiten zu erkennen waren. Am Rand des Transplantates lagen gelb fluoreszierende Zellen, von denen grün fluoreszierende Fortsätze ausgingen, die sich nach Art adrenerger Nerven über die Iris ausbreiteten und gelegentlich Wachstumskolben bildeten (Abb. 1). 8 Wochen nach der Transplantation war das die Iris überziehende Netz von grün fluoreszierenden Fortsätzen, die von intensiv fluoreszierenden, elongierten chromaffinen Zellen ausgingen, erheblich dichter. Eine quantitative Auswertung der Reinnervation der Iris durch transplantierte chromaffine Zellen wurde nicht durchgeführt.

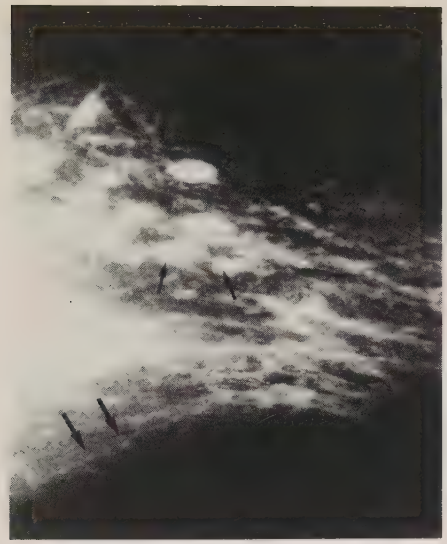


Abb. 1: Fluoreszierende, CA-haltige chromaffine Zellen und Zellfortsätze in einem Häutchenpräparat der Iris 8 Wochen nach Transplantation von NNM in die vordere Augenkammer und Entfernung des ipsilateralen Ganglion cervicale superius. Einige Fortsätze lassen Varikositäten erkennen (große Pfeile). Die Zellkerne erscheinen ausgespart (kleine Pfeile). Glyoxylsäuremethode zur Darstellung von CA. x 5o

c. Beobachtungen an Semi-Dünnschnitten

Die transplantierten Nebennierenmarkzellen lagen meist in Gruppen, gelegentlich aber auch einzeln im lockeren und stark vaskularisierten Bindegewebe der Iris. Sie hatten eine polymorphe und häufig elongierte Gestalt und waren oft von Schwannzellen umgeben. Außer den fein granulierten chromaffinen Zellen beobachteten wir vereinzelt mittransplantierte Nervenzellen, die auf Grund ihres größeren Zellkörpers und runden Kerns mit prominenten Nukleolen einwandfrei diagnostizierbar waren.

d. Elektronenmikroskopie

A. Nebennierenmark in situ (s. a. Habura-Flüh, in Vorbereitung)

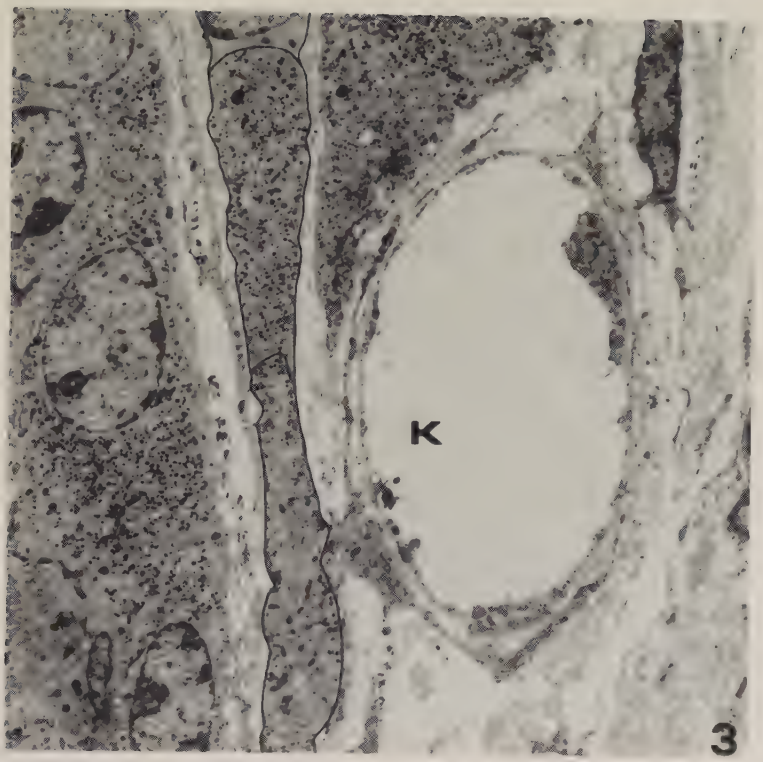
Übersichtsvergrößerungen zeigten ein erhebliches Überwiegen (85-90 %) von Adrenalin (A)-haltigen Zellen, deren spezifische Granulärvesikel (mittlerer Durchmesser 170 nm) einem Kern geringer bis mittlerer Elektronendichte enthielten (vgl. Hopwood, 1971). Die meisten Noradrenalin (NA)-speichernden Zellen, erkennbar an ihren hoch elektronendichten Granulärvesikeln, gehörten zur Gruppe der kleingranulären Zellen des Nebennierenmarks (mittlerer Vesikeldurchmesser 80 nm), die bei dieser Spezies ungewöhnlich häufig sind. NA-Zellen mit grossen Speichervesikeln (170 nm) waren außerordentlich selten zu finden. Außer den NA-haltigen kleingranulären Zellen kam ein zweiter kleingranulärer Zelltyp vor, der Vesikel mit Kernen geringer bis mittlerer Elektronendichte enthielt. Vereinzelt beobachteten wir sympathische Nervenzellen. A-, NA- und Nervenzellen wurden von cholinergen Axonen innerviert, die typische Synapsen mit prä- und postsynaptischen Membranspezialisierungen bildeten. Kleingranuläre Zellen wiesen im Gegensatz

zu "normalen" A- und NA-Zellen Fortsätze auf, die sowohl im Nebennierenmark als auch in der Rinde gefunden wurden.

B. Neuronale Transformation von chromaffinen Zellen im Transplantat

4 Wochen nach der Transplantation und Entfernung des Ganglion cervicale superius waren in Dünnschnitten durch das Transplantat häufig Fortsätze zu erkennen, die von chromaffinen Zellen ausgingen (Abb. 2 u. 3). In der Regel war nur ein einziger Fortsatz zu erkennen, der aus einer chromaffinen Zelle entsprang, wobei die Zelle fließend in den Fortsatz überging. Im Zentrum des Transplantates zeigten die Fortsätze meist einen bogenförmigen Verlauf, während am Rand des Transplantates häufig elongierte Zellen mit gestreckten Fortsätzen zu beobachten waren. Bündel von Fortsätzen waren häufiger zu sehen als einzeln verlaufende, wobei oftmals Fortsätze, die nach Applikation des falschen adrenergen Transmitters 5-OHDA Speichervesikel mit Kernen hoher Elektronendichte enthielten und nicht markierte, vermutlich cholinerge Axone, dicht beieinander lagen (Abb. 4). Die Fortsätze der chromaffinen Zellen ließen sich nach 5-OHDA-Gabe von postganglionären sympathischen Nervenfasern mittransplantierter Ganglienzellen dadurch unterscheiden, daß sie außer kleinen dichtkernigen Vesikeln (Durchmesser 40-80 nm) manchmal zusätzlich große "chromaffine" Speichervesikel (Durchmesser 100-200 nm) enthielten.
Die Fortsätze waren meist in typischer Weise von Schwannzellen umgeben; nackte Varikositäten fanden wir nur in der Nähe der Mm. sphincter et dilatator pupillae.

Abb. 2: Adrenale chromaffine Zellen und Zellfortsätze (Zellgrenzen schwarz umrandet) in der vorderen Augenkammer 4 Wochen nach der Transplantation. Die Zellkörper gehen fließend in die Fortsätze über; beide enthalten die typischen "chromaffinen" Speichervesikel, die überwiegend Kerne von mittlerer Elektronendichte als Hinweis auf die Speicherung von A enthalten. ×12000


K
3

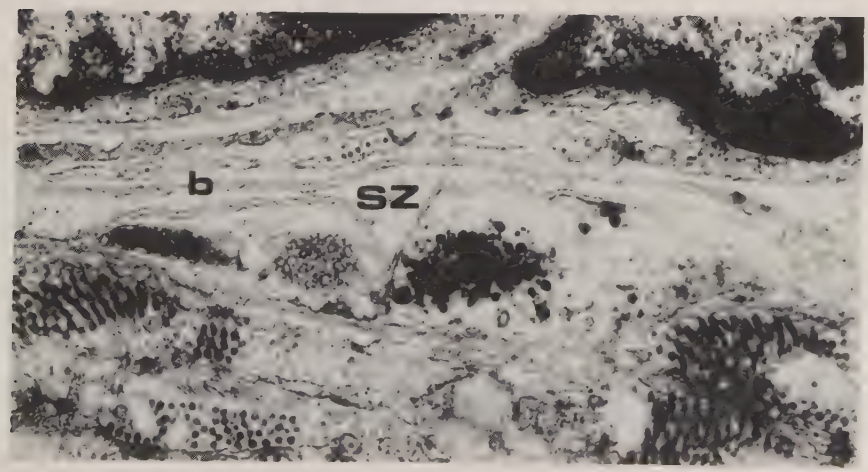

b
SZ

Abb. 3: Adrenale chromaffine Zellen und Zellfortsätze (Zellgrenzen schwarz nachgezeichnet) in der vorderen Augenkammer 4 Wochen nach der Transplantation. Der Organellenbestand des Anfangsabschnitts der Fortsätze entspricht weitgehend dem der Perikaryen. Kapillare (K). x 5400

Abb. 4: Zwei "neuronale" Zellfortsätze im Irisstroma 4 Wochen nach Transplantation von adrenalen chromaffinen Zellen in die vordere Augenkammer und Entfernung des ipsilateralen Ganglion cervicale superius. Die Tiere erhielten vor der Perfusion 5-OHDA, das deutlich sichtbar nur in einen der beiden Fortsätze aufgenommen wurde. Fast alle Speichervesikel des markierten Fortsatzes enthalten "cores" hoher Elektronendichte. Die Durchmesser dieser Vesikel schwanken zwischen 40 und 130 nm. Es ist daher nicht eindeutig zu klären, ob es sich hier um den Fortsatz einer chromaffinen oder einer sympathischen adrenergen Nervenzelle handelt. Der nicht markierte Fortsatz enthält kleine helle Vesikel (Durchmesser 40-60 nm) und ist wahrscheinlich cholinerg. Schwannzelle (sz), Basallamina (b). x 36000

Die Fortsätze der chromaffinen Zellen bestanden aus Neurofilament- und Neurotubuli-reichen intervarikösen Abschnitten, die mit Varikositäten mit unterschiedlichen Granulapopulationen alternierten. Fortsätze, die sich ohne scharfe Grenze aus dem Perikaryon heraus entwickelten und konisch verjüngten, zeigten in den breiten Anfangsabschnitten wie in den Zellsomata hauptsächlich große "chromaffine" Granulärvesikel (Durchmesser 100-200 nm), die aber mit kleinen Vesikeln (40-80 nm) vermischt waren. In den terminalen Varikositäten herrschte hingegen eine Population von kleinen dichtkernigen Vesikeln (40-80 nm) mit nur gelegentlich vorkommenden großen "chromaffinen" Granulärvesikeln vor (Abb. 5).
Zwischen sympathektomierten und nicht sympathektomierten Tieren ergaben sich weder Unterschiede in der Morphologie der Fortsätze noch in der Aufnahmefähigkeit für 5-OHDA.
8 Wochen nach der Transplantation waren die chromaffinen Zellen weiterhin intakt. Die Fortsätze dieser Zellen, gelegentlich auch die Zellkörper selber, zeigten eine Aufnahme von 5-OHDA in Speichervesikel (Abb. 6 u. 7). 6-OHDA führte in einigen Zellen und deren Fortsätzen zum Anschwellen der Mitochondrien.
12 Wochen nach der Transplantation hatte sich die Fortsatzbildung weiterhin verstärkt.

C.M. sphincter und M. dilatator pupillae: Kontrolluntersuchung

Bündel von marklosen Axonen, die kleine agranuläre Vesikel (Durchmesser 40-60 nm) und gelegentlich große granuläre Vesikel (Durchmesser 70 - 120 nm) enthielten und die kein 5-OHDA aufnahmen, näher-

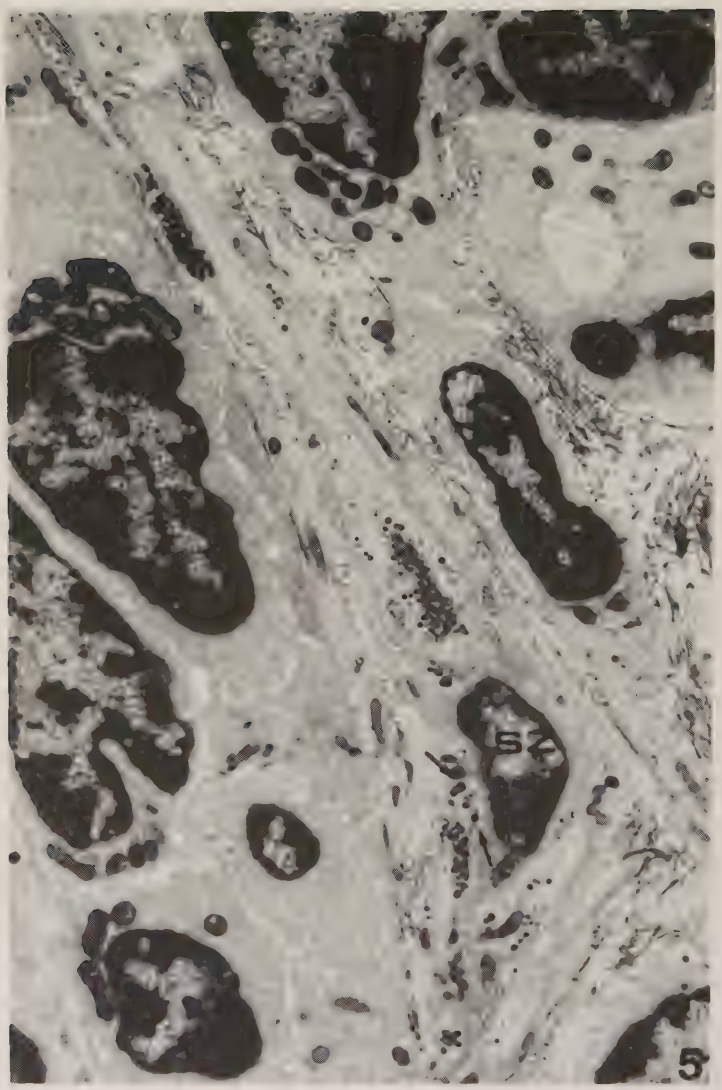
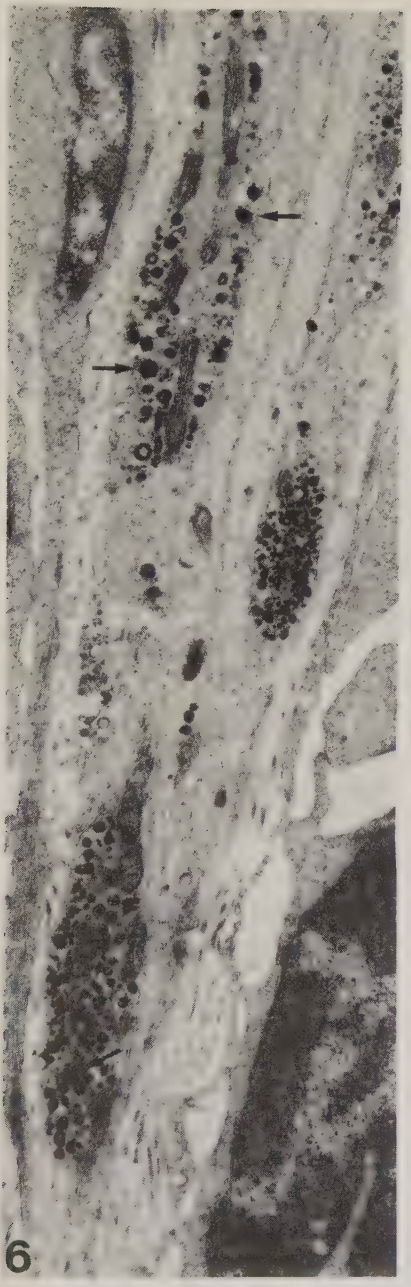


Abb. 5: Mit 5-OHDA markierte Fortsätze in der Umgebung eines Transplantats 4 Wochen nach der Operation und Entfernung des ipsilateralen Ganglion cervicale superius. Die Fortsätze enthalten hoch elektronendichte Speichervesikel, von denen einige (Pfeile) aufgrund ihres besonders großen Durchmessers (150-200 nm) als "chromaffine" Speichervesikel zu identifizieren sind (s.a. Abb. 6 u. 7). Schwannzelle (sz). ×12000



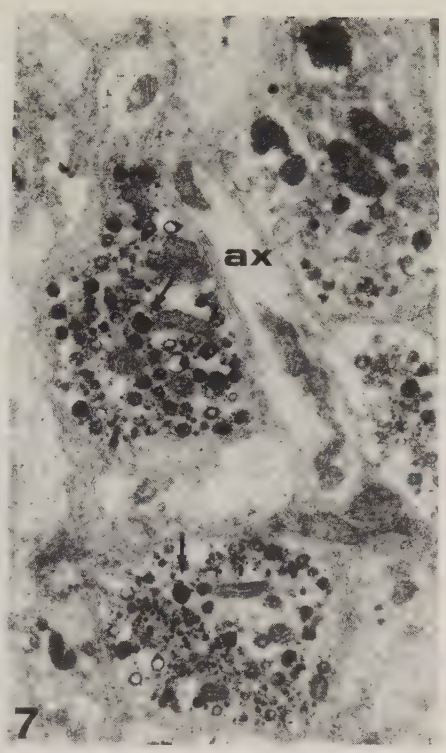


Abb. 6 u. 7: Fortsätze in der Nähe eines Transplantats (8 Wochen nach der Transplantation; Entfernung des ipsilateralen Ganglion cervicale superius) mit Speichervesikeln verschiedener Größen, von denen die meisten nach Applikation von 5-OHDA elektronendichte "cores" aufweisen. Die Durchmesser einiger besonders großer Speichervesikel (Pfeile) entsprechen den Durchmessern "chromaffiner" Vesikel in den Perikaryen transplantierter chromaffiner Zellen. Nicht mit 5-OHDA markierte Axone (ax) mit Neurotubuli und -filamenten.

×24000

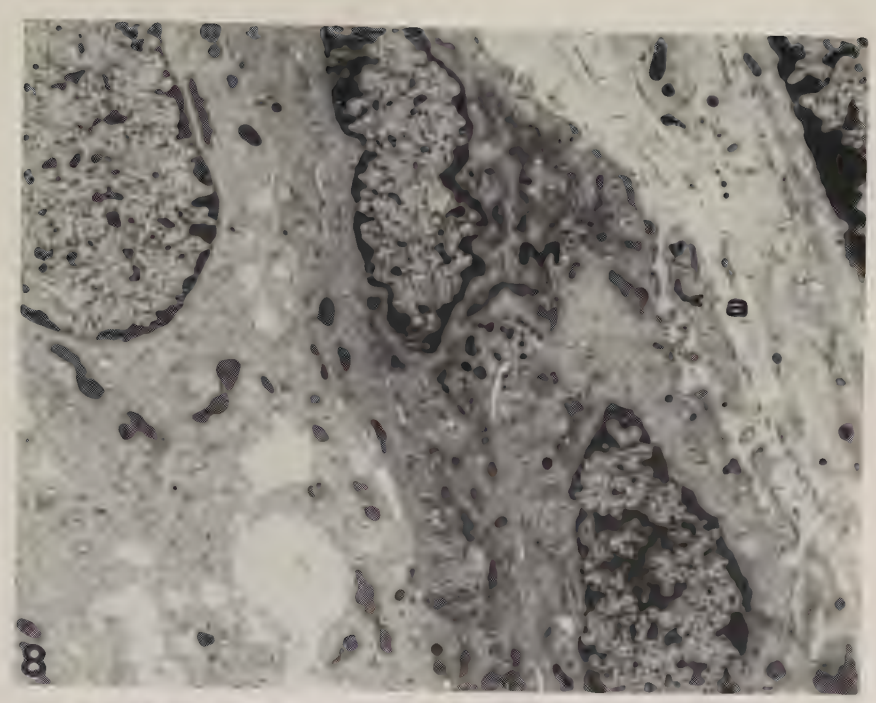
ten sich den glatten Muskelzellen des M. sphincter pupillae bis zu einem Abstand von ungefähr 20 nm. Eine Markierung mit 5-OHDA beobachteten wir dagegen vereinzelt an Axonen, die überwiegend kleine granuläre Vesikel (Durchmesser etwa 50 nm), sehr selten große Granulärvesikel (Durchmesser 80-120 nm) enthielten. In Übereinstimmung mit den Befunden von Nishida et al. (1969) betrug das Verhältnis von markierten, d.h. adrenergen, zu nicht-adrenergen Axonen, im M. sphincter pupillae etwa 15:85.

Im Gegensatz zum M. sphincter pupillae fanden wir in der Nähe des M. dilatator pupillae fast alle Axone mit 5-OHDA markiert. Der geringste beobachtete Abstand zwischen ihnen und den Muskelzellen betrug etwa 80 nm. Vereinzelt beobachteten wir mit 5-OHDA nicht markierte Axone, was mit den Befunden von Csillik und Koelle (1965) und Eränkö und Räisänen (1966) übereinstimmt.

Eine funktionelle Innervation des M. dilatator pupillae durch nicht-adrenerge Axone ist bis jetzt aber noch nicht bewiesen.

D. Beziehung der Fortsätze von transplantierten chromaffinen Zellen zu glatten Muskelzellen der Mm. sphincter et dilatator pupillae.

Nach Sympathektomie und Applikation von 5-OHDA zeigten sich in der Umgebung der Mm. sphincter et dilatator pupillae außer den nicht markierten, also cholinergen Axonen aus dem Ciliarganglion Axone mit markierten Speichervesikeln (Durchmesser 40-80 und 100-200 nm). Der geringste Abstand zwischen den markierten, schwannzellfreien und daher terminalen Axonen und der Muskulatur betrug beim M. dilatator ungefähr 120 nm und beim M. sphincter pupillae ungefähr 80 nm (Abb. 8 u. 9).


M
a
8

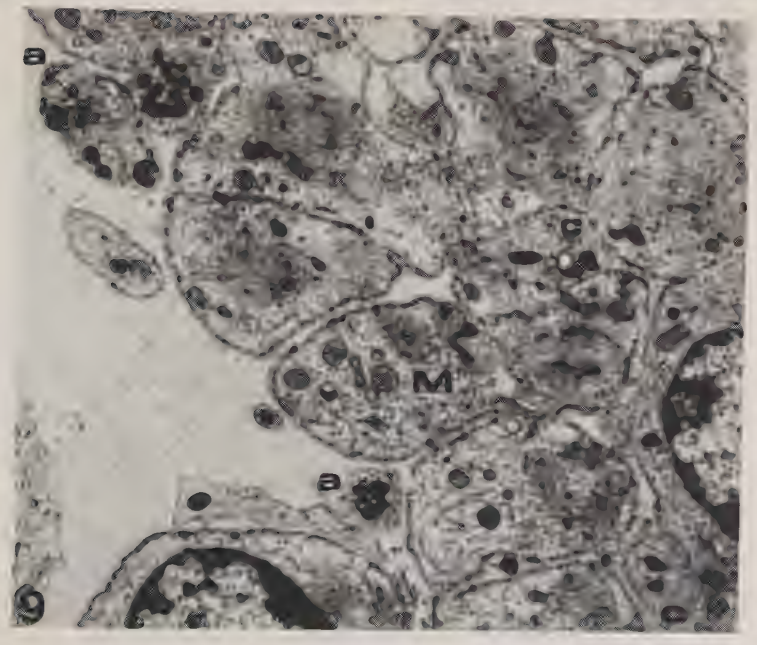

a
M
a
9

Abb. 8: Mit 5-OHDA markierte adrenerge Faser (a) am M. dilatator pupillae (M). Die großen dichtkernigen Vesikel haben einen Durchmesser von etwa 100 bis 130 nm. Der Abstand zwischen den Axonen, die an dieser Stelle noch einseitig von einer Schwannzellamelle bedeckt sind, und den Muskelzellen beträgt 120 bis 150 nm. x 12000

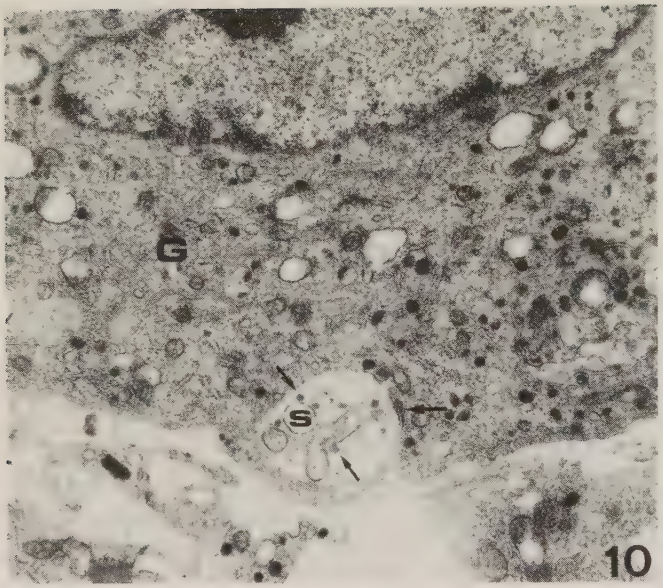
Abb. 9: Mit 5-OHDA markierte,adrenerge (a) und nicht markierte, cholinerge (c) Axone an Zellen des M. sphincter pupillae (M). Die adrenergen Axone sind teilweise frei von einer Schwannzellhülle (Pfeile) und nähern sich den glatten Muskelzellen an den hier abgebildeten Stellen bis auf 150 nm. Die Durchmesser der großen Granulärvesikel betragen 120 bis 150 nm. x 15000

E. Reinnervation von transplantierten chromaffinen Zellen

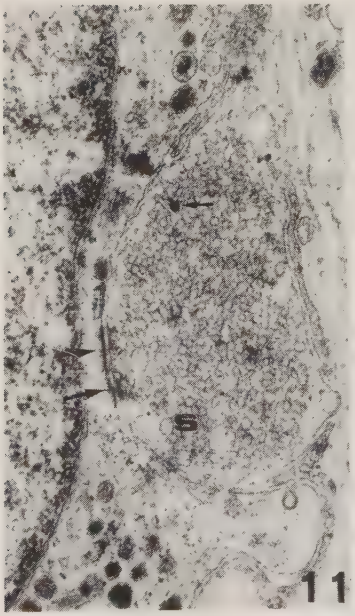
Bei Tieren, die mit 5-OHDA behandelt und sympathektomiert waren, fanden wir an chromaffinen Zellen synaptische Endigungen, die den cholinergen Synapsen an chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks in situ glichen (Coupland, 1965, 1972; Grynszpan-Winograd, 1975). Diese meist kugeligen synaptischen Endigungen hatten einen Durchmesser von etwa 3-5 µm und lagen gewöhnlich in einer Einbuchtung des Perikaryons der chromaffinen Zellen (Abb. 10 u. 11). Auf der präsynaptischen Seite sah man kleine helle Bläschen von etwa 40-60 nm Durchmesser und vereinzelt Mitochondrien, auf der postsynaptischen Seite eine tpyische postsynaptische Membranverdichtung. Der synaptische Spalt, etwa 25 nm breit, zeigte ebenfalls eine Ansammlung dichten Materials. In der Regel lagen die Zellen mit cholinergen Synapsen in der Peripherie der Transplantate und in der Richtung des Verlaufs der cholinergen Axone des Ciliarganglions zum M. sphincter pupillae.
Noradrenerge Synapsen an transplantierten chromaffinen Zellen konnten wir weder bei sympathektomierten noch bei nicht sympathektomierten Tieren beobachten.
In einem Falle fanden wir nach Gabe von 5-OHDA eine adrenerge und eine cholinerge Synapse an einem Fortsatz, der möglicherweise als Dendrit zu einem mittransplantierten sympathischen Neuron gehörte (Abb. 12 u. 13).

F. Kontakte chromaffiner Zellen untereinander

Transplantierte chromaffine Zellen waren wie unter in situ-Bedingungen häufig durch Desmosomen miteinander verbunden. Daneben fanden wir spe-

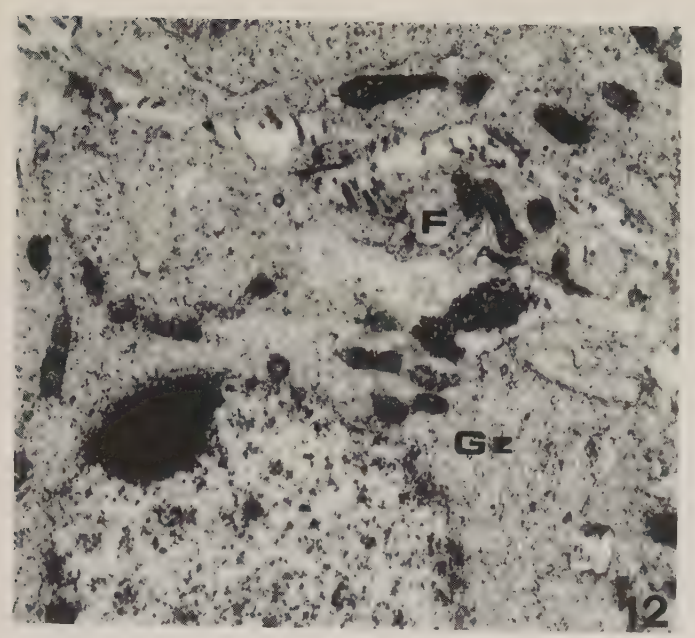


× 18 0 0 0



× 36 0 0 0

Abb. 10 u. 11: Cholinerge Synapsen (s) an transplantierten chromaffinen Zellen nach Entfernung des ipsilateralen Ganglion cervicale superius und 5-OHDA-Applikation. Kleine helle und große "dense core" - Vesikel (kleine Pfeile). Prä- und postsynaptische Membranspezialisierungen (große Pfeile). Chromaffine Zellen mit typischen Speichervesikeln. Golgikomplex (G).


F
Gz
12

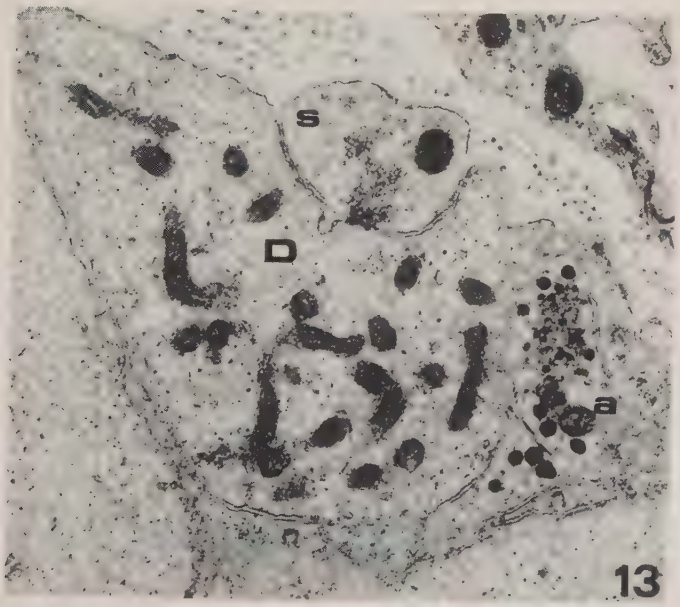

S
D
a
13

Abb. 12: Adrenerge Synapse (Applikation von 5-OHDA) an einem Fortsatz (F), der möglicherweise zu der benachbarten Ganglienzelle (Gz) gehört. x 24000

Abb. 13: Cholinerge Synapse (s) und adrenerges, mit 5-OHDA markiertes Axon (a) mit kleinen (40-60 nm) und großen (150-200 nm) Speichervesikeln an einem Dendriten (D) einer Ganglienzelle. x 30000

zielle Berührungszonen (Abb. 14 u. 15), die den "somatisch efferenten" Synapsen an kleingranulären Zellen in sympathischen Ganglien glichen, wie sie von Siegrist et al. (1968), Matthews und Raisman (1969), Williams und Palay (1969), und Yokota et al. (1973) beschrieben wurden. Derartige Kontakte wurden auch von Unsicker et al. (1977b) zwischen nebeneinanderliegenden chromaffinen Zellen in Transplantaten von Nebennierenmark unter der Nierenkapsel beobachtet. Diese speziellen Berührungszonen bestanden aus asymmetrischen Membranverdickungen, wobei der weniger stark ausgebildeten Membranverdickung perlschnurartig angeordnete "chromaffine" Granula anlagen. Im Vergleich zu den normalerweise hellen Interzellularspalten war der Interzellularspalt im Bereich der "somatisch efferenten" Synapsen etwas dichter. Wir beobachteten, daß die "somatisch efferenten" Synapsen nie gemeinsam mit cholinergen Synapsen an einer Zelle auftraten.

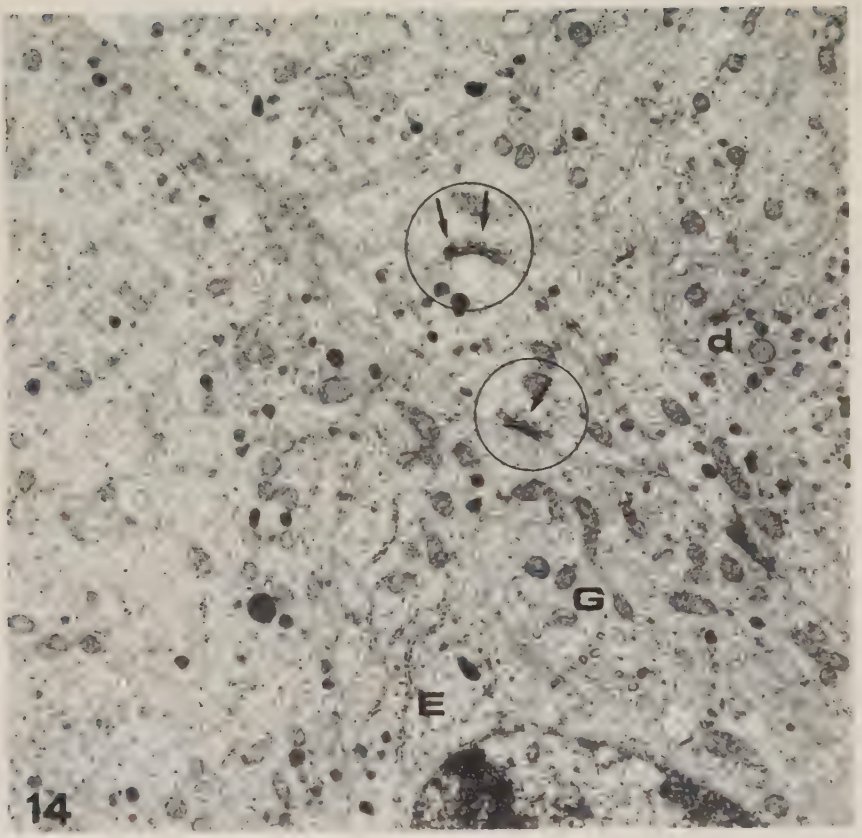
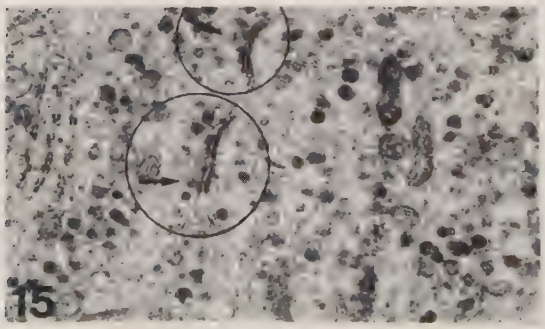


Abb. 14 u. 15: "Somatische efferente Synapsen" zwischen benachbarten chromaffinen Zellen in einem Transplantat in der vorderen Augenkammer. Diese besonderen Kontakte sind gekennzeichnet durch unsymmetrische Membranspezialisierungen und eine Aufreihung von chromaffinen Speichervesikeln (Pfeile) auf der "präsynaptischen" Seite. Desmosom (d), Golgikomplexe (G), rauhes ER (E). × 24 000



4. DISKUSSION

Die funktionelle Topographie der adrenalen chromaffinen Zellen von Säugern in situ ist gekennzeichnet durch ihre enge Beziehung zur Nebennierenrinde, die durch die Abgabe hoher Glucocorticoidmengen (Jones et al., 1977) nach allgemeiner Vorstellung einen wesentlichen Einfluß hat auf die Aktivierung des Enzyms Phenyläthanolamin N-methyltransferase und damit auf die A-Bildung (Wurtman und Axelrod, 1965; Pohorecky und Wurtman, 1971), sowie durch ihre Innervation mittels präganglionärer cholinerger Nervenfasern aus dem N.splanchnicus (Feldberg et al., 1934), die zur Freisetzung der CA führt (Douglas, 1975), aber auch deren Biosynthese reguliert (Kirshner, 1975).

Die vorliegende Untersuchung zeigt, daß adrenale chromaffine Zellen in Transplantaten in die vordere Augenkammer, die dem unmittelbaren Einfluß hoher Glucocorticoiddosen entzogen sind und nicht mehr über den N. splanchnicus innerviert werden, über einen langen Zeitraum ihre morphologische und funktionelle Integrität beibehalten:
Sie enthalten die für chromaffine Zellen charakteristischen großen Speichergranula, die aufgrund histochemischer Kriterien (vgl. Hopwood, 1971) überwiegend dem A-Typ angehören, und speichern, wie biochemische Bestimmungen zeigen (B. Tschechne, in Vorbereitung) CA, und zwar nach 8 Wochen etwa ebensoviel A wie NA.
Zwei Befunde unserer Arbeit müssen besonders hervorgehoben werden:
Die neuronale Transformation der transplantierten chromaffinen Zellen, in deren Verlauf es zur Ausbildung von Fortsätzen mit einer für adrenerge sympathische Neurone typischen Vesikelpopulation und der Herstellung von synapsenähnlichen Beziehungen zwischen den vari-

kösen Endabschnitten dieser Fortsätze und glatten Muskelzellen der Mm. sphincter et dilatator pupillae kommt, und die cholinerge Reinnervation der Zellen, die höchstwahrscheinlich durch Axone aus dem Ganglion ciliare hergestellt wird.

A. Neuronale Transformation

Daß adrenale chromaffine Zellen junger und adulter Tiere unter bestimmten Bedingungen morphologische Eigenschaften von adrenergen sympathischen Neuronen entwickeln können, ist bereits mehrfach beschrieben worden. Olson und Malmfors (1970; s. auch Olson, 1970) transplantierten chromaffine Zellen adulter Ratten in die vordere Augenkammer und stellten mit Hilfe der Falck-Hillarp-Methode zur Darstellung von CA fest, daß diese Zellen Fortsätze ausbildeten, die sich als variköse Axone über die gesamte zuvor sympathisch denervierte Iris ausbreiteten. Unsere fluoreszenzmikroskopischen Befunde bestätigen dieses Ergebnis und unterstreichen, daß es sich bei der neuronalen Transformation chromaffiner Zellen nicht um einen für eine bestimmte Spezies charakteristischen Prozeß handelt. Außer nach Transplantation in die vordere Augenkammer ist über die Ausbildung von Fortsätzen bei chromaffinen Zellen in vivo auch nach Transplantation unter die Nierenkapsel berichtet worden (Unsicker et al., 1977b; Zwarg, in Vorbereitung). In ihren ultramorphologischen Untersuchungen an Transplantaten von chromaffinen Zellen unter die Nierenkapsel bzw. in die vordere Augenkammer berichteten auch Carruba et al., (1974) und Piezzi und Cavicchia (1973), daß die normalerweise abgerundeten oder polygonalen Zellen eine gestreckte Gestalt annahmen. Ferner ist bekannt, daß extraadrenale

chromaffine Zellen in situ Fortsätze ausbilden (s. Furness und Sobels, 1976).

In vitro-Untersuchungen haben bisher nicht klären können, unter welchen Bedingungen adrenale chromaffine Zellen von Säugern neuronale Transformationserscheinungen erkennen lassen. Unsicker und Chamley (1977) beobachteten an Explantaten chromaffiner Zellen von Ratten (2. postnatale Woche) spontan ein Auswachsen von Fortsätzen, das durch DibutyrylcAMP und Theophyllin gehemmt werden konnte (Unsicker und Chamley, 1976). Isolierte Zellen zeigten dieses Fortsatzwachstum nur nach Behandlung mit NGF (Unsicker et al., 1978b). Adrenale chromaffine Zellen neugeborener Meerschweinchen und adulter Rinder (B. Tschechne, in Vorbereitung; Unsicker et al., in Vorbereitung) entwickelten dagegen in vitro auch in Gegenwart von NGF nur sehr spärlich Fortsätze. Ein Vergleich der an chromaffinen Zellen neugeborener Meerschweinchen in vitro gewonnenen Ergebnisse mit den Befunden der vorliegenden Arbeit wirft die Frage nach den Faktoren auf, die für das intensive Fortsatzwachstum der chromaffinen Zellen in Augenkammertransplantaten verantwortlich sind. Die Wahrscheinlichkeit, daß NGF, das an sympathischen Ganglienzellen (Levi-Montalcini und Booker, 1960) und adrenalen chromaffinen Zellen junger Ratten (Unsicker et al., 1978b) ein deutliches "axon sprouting" bewirkt, auch das Fortsatzwachstum an transplantierten chromaffinen Zellen verursacht, ist angesichts der negativen Resultate, die B. Tschechne (in Vorbereitung, s. o.) an Kulturen erzielte und der Tatsache, daß wir mit adulten Tieren arbeiteten, deren Organe im Gegensatz zu neugeborenen Tieren nur Spuren von NGF enthalten, nicht groß. Eine endgültige Aussage zu diesem Problem ließe sich jedoch erst machen, wenn gezeigt würde, daß ein monospezifisches NGF-Antiserum das "axon sprouting" adulter, transplantierter

chromaffiner Zellen nicht hemmt.

B. Vergleich transplantierter chromaffiner Zellen und kleingranulärer Zellen in sympathischen Ganglien

Adrenale chromaffine Zellen in vitro und in Transplantaten unter die Nierenkapsel oder in die vordere Augenkammer gleichen in mancher Hinsicht den kleingranulären Zellen, die in verschiedenen sympathischen Ganglien (Grillo, 1966; Siegrist et al., 1968; Matthews und Raisman, 1969; Williams und Palay, 1969; Yokota, 1973), neuerdings aber auch im NNM des Meerschweinchens (Unsicker et al., 1978a) und anderer Nager (Coupland et al., 1977) gefunden worden sind und die identisch sind mit den von Eränkö und Härkönen (1965; s. a. Jacobowitz, 1970; Van Orden et al., 1970) erstmals beschriebenen "small intensely fluorescent (SIF) cells". Transplantierte chromaffine und SIF-Zellen besitzen Speichergranula, die im Durchschnitt kleiner sind als in chromaffinen Zellen des NNM, und Fortsätze, die im Falle der SIF-Zellen Synapsen mit sympathischen "Hauptzellen", im Falle der transplantierten chromaffinen Zellen synapsenähnliche Kontakte mit glatter Muskulatur (s.u.) bilden können. Chromaffine Zellen in vitro und in Transplantaten stehen im Gegensatz zu chromaffinen Zellen im NNM unter dem Einfluß vergleichsweise geringer Corticosteroidmengen. Unsicker et al. (1978b) haben gezeigt, daß Dexamethason in Dosen, die mit der physiologischen Glucocorticoid-Konzentration im NNM übereinstimmen, die NGF-induzierte neuronale Transformation chromaffiner Zellen in vitro verhindert und an diese Beobachtung die Vermutung geknüpft, daß Glucocorticoide von entscheidender Bedeutung sind für die Differenzierung des NNM zu einem endokrinen Organ. Die jetzt vorgelegten Befunde über die neuronale Transformation

von chromaffinen Zellen in Transplantaten erhärten diesen Verdacht und lassen darüber hinaus erkennen, daß die Transformierbarkeit auch bei chromaffinen Zellen adulter Tiere noch gegeben ist und nicht abhängig ist von einer intakten oder unterbrochenen cholinergen Innervation (s.u.). Die morphologische Ähnlichkeit von SIF- und transplantierten chromaffinen Zellen könnte den Einwand herausfordern, daß nicht die "normalen" chromaffinen Zellen des NNM, sondern die regulär mit Fortsätzen ausgestatteten kleingranulären Zellen des NNM oder gar die in jedem NNM vorhandenen sympathischen Nervenzellen das dichte Netz variköser Axone in der "Gast"-Iris liefern. Diesem Einwand wäre entgegenzuhalten, daß 1. die Zahl der kleingranulären Zellen mit Speichergranula vom A-Typ im NNM in situ außerordentlich gering ist und Mitosen dieser Zellen in Transplantaten nicht beobachtet wurden, und 2. Fortsätze sympathischer Nervenzellen nicht die von uns verschiedentlich in Fortsätzen von Transplantaten beobachteten großen "chromaffinen" Speichergranula besitzen.

Die ultrastrukturelle Analyse der Fortsätze von chromaffinen Zellen in Augenkammer-Transplantaten brachte weitere Hinweise dafür, daß diese Zellen eine intermediäre Position zwischen voll differenzierten adrenalen chromaffinen Zellen und sympathischen adrenergen Neuronen einnehmen. Während in den proximalen Abschnitten der Fortsätze wie in den Zellkörpern die großen "chromaffinen" Speichervesikel dominierten, zwischen die nur vereinzelt kleine (4o-8o nm) helle, gelegentlich auch dichtkernige Bläschen, wie sie für die Varikositäten adrenerger Axone typisch sind, eingestreut waren, bestimmten in den terminalen, häufig varikösen Fortsatzabschnitten die kleinen Speichervesikel das Bild. Von den terminalen Varikositäten adrenerger Neurone

waren die distalen Abschnitte der Fortsätze transplantierter chromaffiner Zellen nur durch das gelegentliche Vorkommen großer "chromaffiner" Speichervesikel (Durchmesser ca. 150 nm) zu unterscheiden. Applikation des falschen adrenergen Transmitters 5-OHDA (Tranzer und Thoenen, 1967) führte nicht nur in allen kleinen, sondern auch in zahlreichen großen "chromaffinen" Speichervesikeln zur Bildung von Kernen mit hoher Elektronendichte bei gleichzeitiger Verschmälerung des hellen Halos zwischen Vesikelmembran und Kern.

In den Axonen adrenerger sympathischer Neurone werden allgemein zwei Populationen von Vesikeln beschrieben (Grillo, 1966; Zusammenfassung bei Burnstock und Costa, 1975): Kleine, meist granuläre Vesikel (30-60 nm) sowie die selteneren (1-5 % der Gesamtpopulation) größeren Granulärvesikel (60-120 nm). Die letzteren waren in unserem Material nicht als eigenständige Population vertreten; möglicherweise entsprechen aber die großen "chromaffinen" Granulärvesikel in den Fortsätzen neuronal transformierter chromaffiner Zellen den größeren Granulärvesikeln adrenerger Neurone.

C. Bildung der Speichervesikel und das Problem der Speicherung von A und NA in einem Axon

Die Frage, wo diese Speichervesikel gebildet werden und welchen Transmitter sie enthalten, können wir aufgrund unserer Untersuchungen nur unvollständig beantworten. Im Falle der "chromaffinen" Speichervesikel liegt es nahe, eine Entstehung im Zellsoma mit anschließendem proximo-distalen axoplasmatischen Transport anzunehmen. Ihr Kern, in der Regel von geringer bis mittlerer Elektronendichte, läßt vermuten,

daß sie überwiegend A enthalten. Kleine Speichervesikel, die in den distalen Fortsatzabschnitten dominierten, wurden nur extrem selten in den Zellsomata gefunden (vgl. B. Tschechne, in Vorbereitung). Man könnte also annehmen, daß dieser Vesikeltyp lokal in den Fortsätzen entsteht. Hinweise auf eine lokale Bildung von Granulärvesikeln in Nervenendigungen adrenerger Neurone liegen vor (Holtzman, 1971; Machado, 1971; Hökfelt, 1973). Andererseits ist bekannt, daß kleine Granulärvesikel in den Zellkörpern adrenerger Neurone schwer zu identifizieren sind, obwohl Anhaltspunkte dafür vorliegen, daß sie von dort in die Nervenendigungen transportiert werden können (Banks und Mayor, 1972; Matthews, 1972). Bezüglich des in unserem Falle in den kleinen Granulärvesikeln gespeicherten Transmitters sind wir auf Spekulationen angewiesen. Die häufig beobachteten Kerne hoher Elektronendichte sprechen für ein primäres Amin, wahrscheinlich NA. Für NA spricht auch die Tatsache, daß mit Zunahme des "axon sprouting" zwischen der 4. und 8. Woche die Menge an biochemisch bestimmtem NA in den Transplantaten so stark zunahm, daß A und NA in der 8. Woche im Verhältnis von etwa 1 : 1 vorhanden waren. Da keine gesicherten Hinweise für das Vorkommen größerer Mengen von NA in den Zellkörpern vorliegen (vgl. B. Tschechne, in Vorbereitung), müssen wir annehmen, daß der überwiegende Teil des gemessenen NA in den Fortsätzen gespeichert wird. Ist diese Annahme richtig, so würde dies bedeuten, daß unter den von uns gewählten experimentellen Bedingungen die CA A und NA in derselben Zelle vorkommen. Die Allgemeingültigkeit des Daleschen Prinzips - ein Neuron, ein Transmitter - ist verschiedentlich bezweifelt worden (vgl. Burnstock, 1976). Auch die chromaffine Zelle scheint während

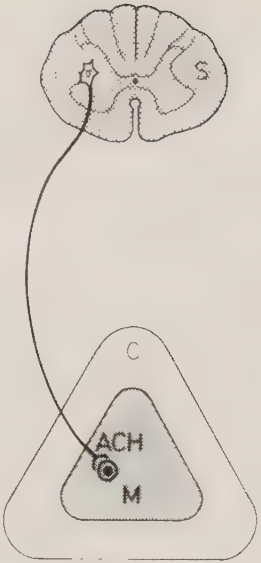
ihrer Entwicklung (Coupland und Weakley, 1968, 1970), in vitro (Coupland und MacDougall, 1966; Unsicker und Chamley, 1977) und unter Transplantationsbedingungen gleichzeitig NA und A speichern zu können. Ob die neuronal transformierte Zelle beide CA als Transmitter verwenden kann, bleibt vorerst offen. Die vorliegenden Untersuchungen zeigen aber zumindest, daß die morphologischen Voraussetzungen für eine Freisetzung von NA oder A gegeben wären. Die terminalen Abschnitte der Fortsätze, die sich den glatten Muskelzellen des M. sphincter bis auf eine Entfernung von 80 nm und denen des M. dilatator auf 120 nm näherten, waren frei von einer Schwannzell-Hülle. Untersuchungen, die Aufschluß geben können über eine funktionelle Reinnervation der Irismuskulatur nach Durchtrennung des Halsgrenzstrangs durch in die vordere Augenkammer transplantierte chromaffine Zellen, sind geplant.

D. Reinnervation transplantierter chromaffiner Zellen

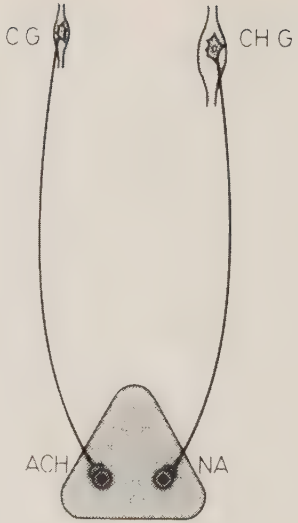
Ein zentraler Aspekt unserer Arbeit war die mögliche Reinnervation der transplantierten chromaffinen Zellen. Chromaffine Zellen des NNM werden ohne Ausnahme von cholinergen präganglionären Axonen innerviert (Coupland, 1965, 1972; Grynszpan-Winograd, 1975). An extraadrenalen chromaffinen Zellen sind vereinzelt adrenerge Synapsen gefunden worden (Mustonen und Teräväinen, 1971; Becker, 1972; Furness und Sobels, 1976). Carruba et al. (1974), die NNM gemeinsam mit dem Ganglion cervicale superius unter die Nierenkapsel verpflanzten, konnten keine Reinnervation der chromaffinen Zellen durch postganglionäre sympathische adrenerge Neurone beobachten. Diesem Ergebnis ent-

sprechen Befunde, die an sympathischen Ganglien in vivo erzielt wurden: Nach Unterbrechung des normalen Inputs konnte eine funktionelle Reinnervation zwar durch cholinerge Nerven parasympathischen und somatischen Ursprungs, nicht dagegen durch sympathische adrenerge Neurone erreicht werden (Hillarp, 1946; Ceccarelli et al., 1971; McLachlan, 1974). Diesen Beobachtungen stehen an Kulturen gewonnene Ergebnisse gegenüber, die zeigten, daß chromaffine Zellen (Unsicker et al., 1978a) und sympathische adrenerge Neurone (Landis, 1976; O'Lague et al., 1976) von adrenergen Axonen reinnerviert werden können. Für eine derartige "unspezifische" Reinnervation haben wir in unseren Untersuchungen keine Anhaltspunkte finden können. Die an transplantierten chromaffinen Zellen gefundenen Synapsen glichen in allen Einzelheiten denen im NNM in situ, nahmen kein 5-OHDA auf und bildeten sich unabhängig davon, ob das Ganglion cervicale superius entfernt oder vorhanden war. Wir nehmen deshalb an, daß diese Synapsen zu Axonen aus dem Ganglion ciliare gehörten, das beim Meerschweinchen ausschließlich aus cholinergen Nervenzellen zusammengesetzt ist (Watanabe, 1972). So entstand eine gemischt parasympathisch/sympathische Kette aus drei hintereinander geschalteten Neuronen (Abb. 16). Für die "Wahl" der "richtigen" Synapse spielte offenbar nur der "richtige" Transmitter, nicht aber die Qualität sympathisch/parasympathisch eine Rolle.

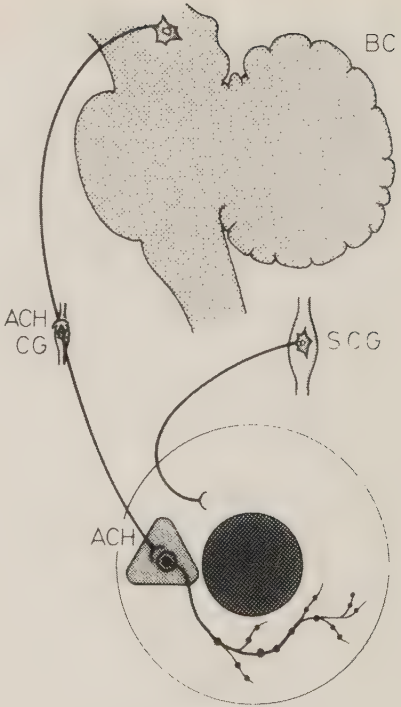
Wie sind die unterschiedlichen Ergebnisse der in vivo- und in vitro-Versuche bezüglich Reinnervation von chromaffinen Zellen zu interpretieren (Tab. 1). Die von Unsicker et al. (1977a, 1978a) in den Kulturen verwendeten chromaffinen Zellen stammten von jungen Tieren, während es sich bei den für unsere Transplantationen verwendeten Versuchstieren um adulte Tiere handelte. Es wäre denkbar, daß die Zellen



in situ



in vitro (Ratte)



im Transplantat
(Meerschweinchen)

16

Abb. 16: Schematische Darstellung der Innervation von adrenalen chromaffinen Zellen in situ, in vitro (Unsicker et al., 1978a) und in Transplantaten in der vorderen Augenkammer. Chromaffine Zellen in situ und in Transplantaten werden von cholinergen (ACH) Neuronen des Rückenmarks (S) bzw. des Ciliarganglions (CG) innerviert. Eine Innervation durch adrenerge Neurone (NA) aus Ganglien des Grenzstrangs (CHG) bzw. aus dem Ganglion cervicale superius ist unter in vitro-, aber nicht unter in vivo-Bedingungen zu beobachten. Nebennierenmark (M), Nebennierenrinde (C), Hirnstamm mit Kleinhirn (BC).

CHROMAFFINE ZELLEN	cholinerge Innervation	adrenerge Innervation	somatische efferente Synapsen
in situ	+	-	-
in Kultur	+	+	+
Nierenkapsel-Transplantate	-	-	+
Augenkammer-Transplantate	+	-	+

Tab. 1: Innervation adrenaler chromaffiner Zellen in situ und unter verschiedenen experimentellen Bedingungen.

junger Tiere noch nicht in der Lage sind, bei der Kontaktbildung zwischen Axonen mit verschiedenen Transmittern zu unterscheiden bzw. daß Axone mit unterschiedlichen Transmittern sich in ihren für die Synapsenbildung verantwortlichen Oberflächenmolekülen noch nicht genügend voneinander unterscheiden. Analysen der Glycoproteine und Glycolipide von Axonen mit verschiedenen Transmittern konnten zur Lösung dieses Problems beitragen. Eine zusätzliche Möglichkeit der Interpretation könnte darin bestehen, daß bei den in vivo Versuchen Milieufaktoren zur Wirkung kommen, die in der Kultur nicht vorhanden sind, und die eine unspezifische Synapsenbildung verhindern. Ferner ist zu berücksichtigen, daß bei den in vitro-Experimenten die chromaffinen Zellen keine Auswahlmöglichkeit bei der Kontaktbildung mit verschiedenen Axonen hatten, da sie entweder zusammen mit adrenergen oder mit cholinergen Neuronen kultiviert wurden.

Interessanterweise konnten wir cholinerge Synapsen nur an den chromaffinen Zellen beobachten, die in der Ausbreitungsrichtung cholinerger Axone des Ciliarganglions in Richtung auf den M. sphincter pupillae lagen. Wir stellten weiterhin fest, daß nie eine cholinerge Synapse an einer chromaffinen Zelle auftrat, die eine "somatisch efferente" Synapse (siehe Befunde) besaß. Eine mögliche Erklärung wäre, daß die cholinergen Axone aus dem Ciliarganglion nur mit für sie günstig gelegenen NNM-Zellen Kontakte eingingen, oder daß Zellen, die schon mit einer Synapse "besetzt" waren, kontaktwillige andere Axone oder Zellen abwiesen. Denkbar wäre auch, daß die transplantierten NNM-Zellen, die in der Verlaufsrichtung der cholinergen Axone lagen, zu weit von den anderen NNM-Zellen entfernt waren, um "somatisch efferente"

Synapsen bilden zu können, während aneinander grenzende Zellen rascher "somatisch efferente" Synapsen bilden konnten, als cholinerge Axone in der Lage waren, mit den chromaffinen Zellen Kontakte einzugehen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit hatte folgende Fragen zum Gegenstand:

1) Werden in die vordere Augenkammer transplantierte adrenale chromaffine Zellen adulter Meerschweinchen reinnerviert und, wenn dies der Fall ist, wie spezifisch ist diese Reinnervation ?

2) Sind diese Zellen befähigt, Fortsätze zu bilden ?

3) Welche ultrastrukturellen Merkmale besitzen diese Fortsätze ?

4) Welcher Art sind die Beziehungen der Endigungen dieser Fortsätze zu den glatten Muskelzellen der Mm. sphincter et dilatator pupillae, die durch Entfernung des Ganglion cervicale superius zuvor sympathisch denerviert worden sind ?

Unter Anwendung der Falck-Hillarp-Methode zur Darstellung von CA und der Elektronenmikroskopie wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1) Transplantierte chromaffine Zellen werden von Synapsen reinnerviert, die kleine helle Bläschen enthalten, den falschen adrenergen Transmitter 5-OHDA nicht aufnehmen und trotz Entfernung des Ganglion cervicale superius vorhanden sind. Es ist anzunehmen, daß diese Synapsen cholinerg sind und von Axonen aus dem Ganglion ciliare gebildet werden.

2) Transplantierte chromaffine Zellen bilden Fortsätze, die sich in der Art der Fortsätze sympathischer adrenerger Neurone in der Iris ausbreiten und die sympathisch denervierten Mm. sphincter et dilatator

pupillae reinnervieren. Diese Fortsätze enthalten in ihren Anfangsabschnitten neben einzelnen kleinen (Durchmesser 40-80 nm) Granulärvesikeln überwiegend große "chromaffine" Speichervesikel. In den terminalen Varikositäten dominieren die kleinen, meist dichtkernigen Speichervesikel. Die Fortsätze transplantierter chromaffiner Zellen nehmen 5-OHDA auf.

Die Befunde werden unter Einbeziehung bereits vorliegender in vivo und in vitro Untersuchungen an adrenalen chromaffinen Zellen diskutiert.

6. LITERATURVERZEICHNIS

BANKS, P., MAYOR, D.:
Intra-axonal transport in noradrenergic neurons in the sympathetic nervous system.
Biochem. Soc. Symp. 36, 133-149 (1972)

BARONDES, S.H.:
Toward a molecular basis of neuronal recognition.
In: The Nervous System (D.B. Tower, ed.), Vol. 1:
The Basic Neurosciences, pp. 129-136. New York: Raven Press (1975)

BECKER, K.: Paraganglienzellen im Ganglion cervicale uteri der Maus.
Z. Zellforsch., 130, 249-261 (1972)

BENNETT, M.R., McLACHLAN, E.M., TAYLOR, R.S.:
The formation of synapses in reinnervated mammalian striated muscle.
J. Physiol. (Lond.) 233, 481-500 (1973a)

BENNETT, M.R., McLACHLAN, E.M., TAYLOR, R.S.:
The formation of synapses in mammalian striated muscle reinnervated with autonomic preganglionic nerves.
J. Physiol. (Lond.) 233, 501-517 (1973b)

BUNGE, R.P.:The expression of neuronal specificity in tissue culture.
In: Neuronal Recognition (S.H. Barondes, ed.), pp. 109-128. London: Chapman and Hall (1976)

BURNSTOCK, G.:
Do some nerve cells release more than one transmitter ?
Neurosci. 1, 239-248 (1976)

BURNSTOCK, G., COSTA, M.:
Adrenergic Neurons. London: Chapman and Hall (1975)

CARRUBA, M., CECCARELLI, B., CLEMENTI, F., MANTEGAZZA, P.:
Selectivity in the reinnervation of iris and adrenal medulla by superior cervical ganglion after transplantation uder the kidney capsule.
Brain Res. 77, 39-53 (1974)

CECCARELLI, B., CLEMENTI, F., MANTEGAZZA, P.:
Synaptic transmission in the superior cervical ganglion of the cat after reinnervation by vagus fibres.
J. Physiol. (Lond.), 216, 87-98 (1971)

CHAMLEY, J.H., CAMPBELL, G.R., BURNSTOCK, G.:
An analysis of the interactions between sympathetic nerve fibers and smooth muscle cells in tissue culture.
Devel. Biol. 33, 344-361 (1973)

CHUNG, S.-H., COOKE, J.:
Observations on the formation of the brain and of nerve connections following embryonic manipulation of the amphibian neural tube.
Proc. Roy. Soc. Lond. B 201, 335-373 (1978)

COUPLAND, R.E.:
Electron microscopic observations on the structure of the rat adrenal medulla.
J. Anat. (Lond.), 99, 255-272 (1965)

COUPLAND, R.E.:
The chromaffin system. In: Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. XXXIII. Catecholamines (H. Blaschko und E. Muscholl, eds.), pp. 16-45, Berlin-Heidelberg-New York: Springer-Verlag 1972

COUPLAND, R.E., MacDOUGALL, J.D.B.:
Adrenaline formation in noradrenaline-storing chromaffin cells in vitro induced by corticosterone.
J. Endocr. 36, 317-324 (1966)

COUPLAND, R.E., KOBAYASHI, S., TOMLINSON, A.:
On the presence of small granule chromaffin (SGC) cells in the rodent adrenal medulla.
Proc. Anat. Soc. Great Britain and Ireland 24/25, 3 (1977)

COUPLAND, R.E., WEAKLY, B.S.:
Developing chromaffin tissue in the rabbit: an electron microscopic study.
J. Anat. (Lond.) 102, 425-455 (1968)

COUPLAND, R.E., WEAKLY, B.S.:
Electron microscopic observation on the adrenal medulla and extra-adrenal chromaffin tissue of the postnatal rabbit.
J. Anat. (Lond.) 106, 213-231 (1970)

CRAIN, S.M.:Neurophysiologic studies in tissue culture. New York: Raven Press (1976)

CRAIN, S.M., PETERSON, E.R.:
Development of specific synaptic networks in cultures of CNS tissues. In: Reviews of Neuroscience (S. Ehrenpreis and I. Kopin, eds.). New York: Raven Press (1976)

CSILLIK, B., KOELLE, G.B.:
Histochemistry of the adrenergic and cholinergic autonomic innervation apparatus as represented by the rat iris. Acta histochem. (Jena) 22, 350-363 (1965)

DOUGLAS, W.W.:
Secretomotor control of adrenal medullary secretion: synaptic, membrane and ionic events in stimulus-secretion coupling. In: Handbook of Physiology, Section 7, Vol. VI, Adrenal Gland, pp. 367-388. American Physiological Society. Washington D.C. (1975)

ERÄNKÖ, O., HÄRKÖNEN, M.:
Monoamine-containing small cells in the superior cervical ganglion of the rat and an organ composed of them. Acta physiol. scand. 63, 511-512 (1965)

ERÄNKÖ, O., RAISÄNEN, L.:
Demonstration of catecholamines in adrenergic nerve fibres by fixation in aqueous formaldehyde solution and fluorescence microscopy.
J. Histochem. Cytochem. 14, 690-691 (1966)

FELDBERG, W., MINZ, B., TSUDZIMURA, H.:
Mechanisms of nervous discharge of adrenaline.
J. Physiol. (Lond.) 81, 286-304 (1934)

FISCHBACH, G.D., BERG, D.K., COHEN, S.A., FRANK, E.:
Enrichment of nerve-muscle synapses in spinal cord-muscle cultures and identification of relative peaks of Ach sensitivity at sites of transmitter release.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. Vol. 40, pp. 347-357 (1976)

FURNESS, J.B., SOBELS, G.:
The ultrastructure of paraganglia associated with the inferior mesenteric ganglia in the guinea-pig.
Cell Tiss. Res. 171, 123-139 (1976)

GOMBOS, G., GANDHOUR, M.S., VINCEDON, G., REEBER, A., ZANETTA, J.-P.:
Formation of the neuronal circuitry of rat cerebellum: plasma membrane modifications. In: Maturation of Neurotransmission. Satellite Symp., 6th Meeting Int. Soc. Neurochemistry, Saint-Vincent, 1977, pp. 1o-22.
Basel: Karger (1978)

GRILLO, M.A.:
Electron microscopy of sympathetic tissues.
Pharmacol. Rev. 18, 387-399 (1966)

GRYNSZPAN-WINOGRAD, O.:
Ultrastructure of the chromaffin cell. In: Handbook of Physiology, Section 7, Vol. VI, Adrenal Gland, pp. 295-308.
American Physiological Society, Washington D.C., 1975

HABURA-FLÖH, O.:
Ultramorphologische, histo- und biochemische Untersuchungen am Nebennierenmark des Meerschweinchens unter besonderer Berücksichtigung der kleingranulären Zellen.
Dissertation Fachbereich Medizin der Christian-Albrechts-Universität Kiel. In Vorbereitung.

HILLARP, N.-A.:
Structure of the synapse and the peripheral innervation apparatus of the autonomic nervous system.
Håkan Ohlssons Boktrykeri, Lund, pp. 1-153 (1946)

HILL, C.E., PURVES, R.D., WATANABE, H., BURNSTOCK, G.:
Specificity of innervation of iris musculature by sympathetic nerve fibres in tissue culture.
Pflügers Arch. 361, 127-134 (1976)

HÖKFELT, T.:On the origin of small adrenergic storage vesicles: evidence for local formation in nerve endings after chronic reserpine treatment.
Experientia (Basel) 29, 580-582 (1973)

HOLTZMAN, E.:
Cytochemical studies of protein transport in the nervous system.
Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B 261, 407-421 (1971)

HOPWOOD, D.:The histochemistry and electron histochemistry of chromaffin tissue.
Progr. Histochem. Cytochem. 3/1 (1971)

JACOBOWITZ, D.:
Catecholamine fluorescence studies of adrenergic neurons and chromaffin cells in sympathetic ganglia.
Fed. Proc. 29, 1929-1944 (1970)

JACOBSON, M.:
Neuronal recognition in the retinotectal system.
In: Neuronal Recognition (S.H. Barondes, ed.), pp. 3-23. London: Chapman and Hall (1976)

JOHNSON, M., ROSS, D., MEYERS, M., REES, R., BUNGE, R.:
Synaptic vesicle cytochemistry changes when cultured sympathetic neurones develop cholinergic interactions.
Nature (Lond.), 262, 308-310 (1976)

JONES, M.T., HILLHOUSE, E.W., BURDEN, J.L.:
Dynamics and mechanics of corticosteroid feedback at the hypothalamus and anterior pituitary gland.
J. Endocrinol. 73, 405-417 (1977)

KIRSHNER, N.:
Biosynthesis of the catecholamines. In: Handbook of Physiology, Section 7, Vol. VI, Adrenal Gland, pp. 341-355. American Physiological Society, Washington, D.C. (1975)

LANDIS, S.C.:
Rat sympathetic neurons and cardiac myocytes developing in microcultures: Correlation of the fine structure of endings with neurotransmitter function in single neurons.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 73, 4220-4224 (1976)

LANGLEY, J.N.:
On the regeneration of preganglionic and postganglionic visceral nerve fibres.
J. Physiol. (Lond.) 22, 215-230 (1897)

LANGLEY, J.N.:
On the union of cranial autonomic (visceral) fibres with the nerve cells of the superior cervical ganglion.
J. Physiol. (Lond.) 23, 240-270 (1899)

LANGLEY, J.N., ANDERSON, H.K.:
On the union of the fifth cervical nerve with the superior cervical ganglion.
J. Physiol. (Lond.) 30, 439-442 (1904a)

LANGLEY, J.N., ANDERSON, H.K.:
The union of different kinds of nerve fibres.
J. Physiol. (Lond.) 31, 365-391 (1904b)

LEVI-MONTALCINI, R., BOOKER, B.:
Excessive growth of the sympathetic ganglia evoked by a protein isolated from mouse salivary glands.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 46, 373-383 (1960)

MACHADO, A.B.M.:
Electron microscopy of developing sympathetic fibres in the rat pineal body. The formation of granular vesicles.
Progr. Brain Res. 34, 171-185 (1971)

MATTHEWS, M.R.:
Evidence suggesting translocation of small dense cored vesicles from the cell bodies to regenerating axon tips of adrenergic neurons.
J. Anat. (Lond.) 111, 508-510 (1972)

MATTHEWS, M.R., RAISMAN, G.:
The ultrastructure and somatic efferent synapses of small granule-containing cells in the superior cervical ganglion.
J. Anat. (Lond.) 105, 255-282 (1969)

McLACHLAN, E.M.:
The formation of synapses in mammalian sympathetic ganglia reinnervated with preganglionic or somatic nerves.
J. Physiol. (Lond.), 237, 217-242 (1974)

MOSCONA, A.A.:
Surface specification of embryonic cells: lectin receptors, cell recognition and specific cell ligands.
In: The Cell Surface in Development (A.A. Moscona, ed.), pp. 67-99. New York: Wiley (1964)

MUSTONEN, H., TERÄVÄINEN, H.:
Synaptic connections of the paracervical (Frankenhäuser) ganglion of the rat uterus examined with the electron microscope after division of the sympathetic and sacral parasympathetic nerves.
Acta physiol. scand. 82, 264-267 (1971)

NELSON, P.G.:
Nerve and muscle cells in culture.
Physiol. Rev. 55, 1-61 (1975)

NISHIDA, S., TROTTER, F., SEARS, M.:
Innervation of the chamber angle of the guinea pig eye.
Exp. Eye Res. 8, 292-296 (1969)

NURSE, C., O'LAGUE, P.H.:
Formation of cholinergic synapses between dissociated sympathetic neurons and skeletal myotubes of the rat in cell culture.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 72, 1955-1959 (1975)

O'LAGUE, P.H., OBATA, H., CLAUDE, P., FURSHPAN, E.J., POTTER, D.D.:
Evidence for cholinergic synapses between dissociated rat sympathetic neurons in cell culture.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 71, 3602-3606 (1974)

O'LAGUE, P.H., MacLEISH, P.R., NURSE, C.A., CLAUDE, P., FURSHPAN, E.J., POTTER, D.D.:
Physiological and morpholigical studies on developing sympathetic neurons in dissociated cell culture.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. Vol. 40, pp. 399-407 (197

OLSON, L.: Fluorescence histochemical evidence for axonal growth and secretion from transplanted adrenal medullary tissue.
Histochemie 22, 1-7 (1970)

OLSON, L., MALMFORS, T.:
Growth characteristics of adrenergic nerves in the adult rat.
Acta physiol. scand., Suppl. 348, 1-112 (1970)

OLSON, M.I., BUNGE, R.P.:
Anatomical observations on the specificity of synapse formation in tissue culture.
Brain Res. 59, 19-33 (1973)

PFENNINGER, K.H., REES, R.P.:
From the growth cone to the synapse. Properties of membranes involved in synapse formation. In: Neuronal Recoguition (S.H. Barondes, ed.), pp. 131-178. London: Chapman and Hall (1976)

PIEZZI, R.S., CAVICCHIA, J.C.:
Explants of adrenal medulla:
A light and electron microscopic study.
Anat. Rec. 175, 71-86 (1973)

POHORECKY, L.A., WURTMAN, R.J.:
Adrenocortical control of epinephrine synthesis.
Pharmacol. Rev. 23, 1-35 (1971)

PURO, D.G., NIRENBERG, M.:
On the specificity of synapse formation.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 73, 3344-3348 (1976)

REES, R., BUNGE, R.P.:
Morphological and cytochemical studies of synapses formed in culture between isolated rat superior cervical ganglion neurons.
J. Comp. Neurol. 157, 1-12 (1974)

REYNOLDS, E.S.:
The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy.
J. Cell. Biol. 17, 208-212 (1963)

RICHARDSON, K.C., JARRET, L., FINKE, E.H.:
Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy.
Stain Technol. 35, 313-323 (1960)

ROSS, D., JOHNSON, M. und BUNGE, R.:
Development of cholinergic characteristics in adrenergic neuron is age dependent.
Nature (Lond.) 267, 536-539 (1977)

SIEGRIST, G., DOLIVO, M., DUNANT, Y., FOROGLOU-KARAMENS, C., de RIBEAUPIERRE, F., ROUILLER, C.:
Ultrastructure and function of the chromaffin cells in the superior cervical ganglion of the rat.
J. Ultrastr. Res. 25, 381-407 (1968)

de la TORRE, J.C., SURGEON, J.W.:
A methodological approach to rapid and sensitive monoamine histofluorescence using a modified glyoxylic acid technique: The SPG method. Histochemistry 49, 325-340 (1976)

TRANZER, J.P., THOENEN, H.:
Ultramorphologische Veränderungen des sympathischen Nervenendigungen der Katze nach Vorbehandlung mit 5- und 6-Hydroxy-Dopamin.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmakol. 257, 343-344 (1967)

TSCHECHNE, B.:
Ultramorphologische, histo- und biochemische Untersuchungen zur Differenzierung adrenaler chromaffiner Zellen des Meerschweinchens in Transplantaten in die vordere Augenkammer und in der Gewebekultur.
Dissertation, Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg, in Vorbereitung.

UNSICKER, K., CHAMLEY, J.H.:
Effects of dbcAMP and theophylline on rat adrenal medulla grown in tissue culture.
Histochemistry 46, 197-201 (1976)

UNSICKER, K., CHAMLEY, J.H.:
Growth characteristics of postnatal rat adrenal medulla in culture.
Cell Tiss. Res. 177, 247-268 (1977)

UNSICKER, K., CHAMLEY, J.H., BURNSTOCK, G.:
Studies on the interaction between nerve fibers from para- and ortho-sympathetic ganglia and adreno-cortical and medullary cells in joint culture.
Cell Tiss. Res. 178, 533-549 (1977a)

UNSICKER, K., ZWARG, U., HABURA, O.:
Electron microscopic evidence for the formation of synapses and synaptoid contacts in adrenal medullary grafts.
Brain Res. 120, 533-539 (1977b)

UNSICKER, K., HABURA-FLOH, O., ZWARG, U., TSCHECHNE, B., TSCHECHNE, D.:
Interactions between autonomic nerves and adrenal chromaffin cells in culture and in two in vivo transplant systems.
In: Peripheral neuroendocrine interaction (R.E. Coupland, W.G. Forssmann, eds.), pp. 60-69. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag 1978a

UNSICKER, K., KRISCH, B., OTTEN, U., THOENEN, H.:
Nerve growth factor-induced fiber outgrowth from isolated rat adrenal chromaffin cells:
Impairment by glucocorticoids.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 75, 3498-3502 (1978b)

UNSICKER, K., GRIESSER, H., LINDMAR, R., LÖFFELHOLZ, K., WOLF, U.:
Bovine adrenal chromaffin cells in culture. (in Vorbereitung).

VAN ORDEN, L.S., BURKE, J.P., GEYER, M. und LODOEN, F.V.:
Localization of depletion-sensitive and depletion-resistant norepinephrine storage sites in autonomic ganglia.
J. Pharmac. Exp. Ther. 174, 56-71 (1970)

WATANABE, H.:
The fine structure of the ciliary ganglion of the guinea pig.
Arch. histol. jap. 34, 261-276 (1972)

WILLIAMS, T.H., PALAY, S.L.:
Ultrastructure of the small neurons in the superior cervical ganglion.
Brain Res. 15, 17-34 (1969)

WURTMAN, R.J., AXELROD, J.:
Adrenaline synthesis: control by the pituitary gland and adrenal glucocorticoids.
Science 150, 1464 (1965)

YOKOTA, R.: The granule-containing cell somata in the superior cervical ganglion of the rat as studied by a serial sampling method for electron microscopy.
Z. Zellforsch. 141, 331-345 (1973)

ZWARG, U.: Chromaffine Zellen aus dem Nebennierenmark des Meerschweinchens in Transplantaten unter die Nierenkapsel.
Dissertation Fachbereich Medizin der Christian-Albrechts-Universität Kiel, in Vorbereitung.

Zur Beachtung bei den Vergrößerungsmaßstäben der Abbildungen:
Bei der Drucklegung sind alle Photographien um 30 % verkleinert worden.

LEBENSLAUF

Am 22.7.1948 wurde ich, Dietrich Karl-Heinz Tschechne, als Sohn des Zahnarztes Dr. Werner Tschechne und seiner Ehefrau Irmtraut, geb. Dannheiser, in Kiel geboren und im September 1948 evangelisch getauft. Von 1955 bis 1959 besuchte ich die hiesige Goethe-Grundschule. Nach 1959 erfolgter Übergangsprüfung kam ich in die Kieler Gelehrtenschule und erhielt dort am 5.6.1969 das Reifezeugnis.
Nach einjähriger Tätigkeit im Krankenhaus und einem Semester Jura-Studium wurde ich zum Sommersemester 1971 zum Studium der Zahnmedizin an der Christian-Albrechts-Universität Kiel zugelassen. Im Wintersemester 1971/72 legte ich mein Vorphysikum und im Wintersemester 1973/74 mein Physikum ab.
Am 2.12.1976 beendete ich mein Staatsexamen und erhielt am 9.12.1976 die Bestallung als Zahnarzt. Seit Januar 1977 bin ich mit der Zahnärztin Barbara Gieshoff verheiratet.
Seit dem 1. Januar 1978 leiste ich meinen Wehrdienst als Stabsarzt bei der Bundeswehr ab.

Herrn Prof. Dr. H. Leonhardt und Herrn Prof. Dr. K. Unsicker danke ich für die Bereitstellung von Arbeitsplätzen an den Anatomischen Instituten Kiel und Marburg.

Ferner danke ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. K. Unsicker für die Überlassung des Themas und seine wertvolle Hilfe und vielfältige Kritik bei der Durchführung dieser Arbeit.
Ferner gilt mein Dank Frau König, Frau Waluk, Herrn Mrohs und Frau Fischer an den Anatomischen Instituten Kiel und Marburg, die mich bei der technischen Durchführung dieser Arbeit unterstützten.

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

"Neuronale Transformation und Reinnervation von adrenalen chromaffinen Zellen in Transplantaten in der vorderen Augenkammer des Meerschweinchens"

in den Anatomischen Instituten Marburg und Kiel unter Leitung der Herren Prof. Dr. K. Unsicker und Prof. Dr. H. Leonhardt mit Unterstützung durch Herrn Prof. Dr. K. Unsicker ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.
Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.